昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, June 2016, 59(6): 592 - 601 doi:10.16380/j.kcxb.2016.06.002

绿盲蝽气味受体基因 *AlucOR*40 的克隆及功能研究

张志翔[1,2], 张美萍[1,*], 王桂荣[2], 刘　杨[2,*]

(1. 山西师范大学生命科学学院, 山西临汾 041004; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要:【目的】从绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 触角中克隆气味受体基因 *AlucOR*40,研究该气味受体基因在绿盲蝽不同组织中的表达水平,然后对该基因的功能进行研究,为理解绿盲蝽的嗅觉识别机制提供理论基础。【方法】在绿盲蝽成虫触角转录组测序与分析的基础上,通过 PCR 技术克隆得到气味受体基因 *AlucOR*40 的全长序列。用半定量 RT-PCR 研究该基因在雌雄虫不同组织中的表达水平。然后通过爪蟾卵母细胞体外表达该基因,并结合双电极电压钳检测了该气味受体对 60 种气味分子包括绿盲蝽性信息素组分和植物挥发物的反应。然后,利用触角电位技术测定羽化后 3 d 的绿盲蝽成虫对 AlucOR40 的气味配体的触角电位反应。【结果】克隆了 *AlucOR*40(GenBank 登录号: KU886190)。*AlucOR*40 编码 398 个氨基酸,蛋白具有 7 个跨膜结构域,N 末端位于胞内,C 端位于细胞外,符合昆虫气味受体的典型特征。半定量 RT-PCR 的结果显示, *AlucOR*40 在触角中特异表达,且在雄虫触角中的表达水平高于雌虫。双电极电压钳记录结果显示,AlucOR40 只对反-2-己烯醇一种气味分子具有特异反应。EAG 实验结果表明,羽化后 3 d 的绿盲蝽雌雄虫都对反-2-己烯醇有反应,且雄虫触角的 EAG 反应显著高于雌虫。【结论】结果提示 AlucOR40 参与了绿盲蝽对反-2-己烯醇的识别过程,推测其在绿盲蝽交配过程中雄虫对雌虫的识别中发挥作用。

关键词: 绿盲蝽; 气味受体; 半定量 RT-PCR; 双电极电压钳; 触角电位

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2016)06-0592-10

Cloning and characterization of an odorant receptor gene *AlucOR*40 in *Apolygus lucorum* (Hemiptera: Miridae)

ZHANG Zhi-Xiang[1,2], ZHANG Mei-Ping[1,*], WANG Gui-Rong[2], LIU Yang[2,*] (1. College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041000, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract:【Aim】This study aims to clone an odorant receptor gene, *AlucOR*40, from *Apolygus lucorum*, to characterize its expression profiles in different tissues and to explore its function, so as to provide a theoretical basis for understanding the mechanisms of odor reception in *A. lucorum*.【Methods】The antennal transcriptome sequencing and RT-PCR amplification was used to clone the full-length cDNA of *AlucOR*40. The relative expression levels of this gene in different tissues of male and female adults of *A. lucorum* were detected using semi-quantitative RT-PCR. Through the combination of heterologous expression in *Xenopus* oocytes and two-electrode voltage clamp electrophysiological recording technique, the response of this odorant receptor to 60 odorants including sex pheromone of *A. lucorum* and plant

---

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471833, 31301245)

作者简介: 张志翔, 男, 1991 年 11 月生, 山西临汾人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生化与分子生物学, E-mail: zhang3121414@126.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: zhangmp2006@163.com; yangliu@ippcaas.cn

收稿日期 Received: 2016-03-24; 接受日期 Accepted: 2016-04-28

volatiles was determined. The EAG responses of the 3-d-old adults of *A. lucorum* to the odorant ligand of AlucOR40 were further measured. 【Results】*AlucOR*40 (GenBank accession number: KU886190) was cloned. *AlucOR*40 encodes 398 amino acids and the deduced protein has 7 transmembrane domains with an intracellular N-terminus and an extracellular C-terminus, which conforms to the typical structure of insect odorant receptors. The results of semi-quantitative RT-PCR showed that *AlucOR*40 was specifically expressed in the antenna of adults and the expression level was obviously higher in males than females. Two-electrode voltage clamp electrophysiological recording showed that AlucOR40 specifically responded to (*E*)-2-hexenol among the tested odorants. The EAG experiments showed that the 3-d-old adults had EAG response to (*E*)-2-hexenol, but the responses of males were significantly higher than those of females. 【Conclusion】Our results suggest that the AlucOR40 is involved in identification of (*E*)-2-hexenol and may play an important role in identification of female by male during mating process.

Key words: *Apolygus lucorum*; odorant receptor; semi-quantitative RT-PCR; two-electrode voltage clamp; electroantennography

绿盲蝽 *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür)属于半翅目(Hemiptera)盲蝽科(Miridae),是在全世界范围内广泛分布的一种农业害虫,其能在多种植物上进行取食,其寄主植物涉及 39 科 176 种(Pan *et al*., 2013)。在我国,绿盲蝽主要分布在黄河流域和长江流域,且其主要危害作物为棉花。早在 Bt 棉花种植之前,绿盲蝽在棉田中是属于次要害虫。为了控制棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 的发生与危害,我国于 1997 年开始商业化种植 Bt 抗虫棉。抗虫棉的大规模种植有效地控制了棉铃虫和棉大卷叶螟 *Sylepta derogata* 等鳞翅目昆虫的危害,但同时也导致棉田中害虫地位发生了一系列的演替,2004 年后绿盲蝽数量剧增,对棉花生产造成巨大的危害,成为影响我国棉花生产的主要害虫(陆宴辉和吴孔明, 2008; Lu *et al*., 2010)。此外,随着绿盲蝽数量的剧增,其对枣、葡萄、樱桃、桃、苹果、茶和马铃薯等作物生产也构成了严重的威胁,成为影响我国农作物生产的重要农业害虫(陆宴辉和吴孔明, 2008)。因此,如何有效控制绿盲蝽的危害是目前棉花害虫防治所面临的一个重要科学问题。

昆虫生存环境中存在着大量的化学信息,对化学信息尤其是对气味信息的识别对昆虫的生存和繁殖具有重要的意义。如昆虫通过对植物挥发物的识别来定位寄主,与昆虫的取食行为密切相关。而雄虫通过对性信息素的识别定位交配对象,进而完成交配,对种群的繁殖具有重要意义。利用昆虫的信息素对昆虫进行行为调控已成为一种新型的绿色害虫防治技术。随着绿盲蝽的危害不断上升,人们对绿盲蝽信息化合物的鉴定和活性研究方面进行了大量工作。陈展册等(2010)测定了绿盲蝽成虫对 9 种性信息素及其类似物和 12 种植物挥发物的触角电位(EAG)反应,发现绿盲蝽对于丁酸酯类和绿叶气味物质的反应较强。张涛(2011)对绿盲蝽的性信息素进行了提取和鉴定,其性信息素组分分别是 4-氧代-反-2-己烯醛[(*E*)-4-oxo-2-hexenal]、反-2-丁酸己烯酯[(*E*)-2-hexenyl butyrate]和丁酸己酯(hexyl butyrate),其中丁酸己酯为雄虫分泌的反性信息素。潘洪生(2013)发现绿盲蝽比较偏好开花植物,从 3 种蒿类寄主植物花香挥发物中均鉴定出 6 种对绿盲蝽雌雄虫均有较高 EAG 反应的物质。

昆虫感知外界气味分子是通过嗅觉系统中多种不同的蛋白组分协同完成,但是其中起关键作用的是气味受体(odorant receptor, OR)。昆虫气味受体是由高度变异的传统气味受体(conventional odorant receptor, ORx)和高度保守的非典型受体(olfactory receptor co-receptor, Orco)以异源二聚体的方式组成的一个门控离子通道(Mombaerts, 1999; Dobritsa *et al*., 2003; Larsson *et al*., 2004; Benton *et al*., 2006)。气味受体将环境中小分子化学信息物质所携带的信息转化为电信号,导致嗅觉神经元产生动作电位,使昆虫感知到外界气味进而做出相应的行为反应(Leal, 2013)。此外,气味受体可以按照识别受体的不同分为识别普通气味的普通气味受体和识别昆虫性信息素的性信息素受体(pheromone receptor, PR)(Tamura *et al*., 2011; Liu *et al*., 2012; Sun *et al*., 2013)。

尽管前人在绿盲蝽信息化合物的鉴定和活性研究方面进行了大量工作,但对于其气味的识别机制尤其是气味受体的功能研究还不够深入。2014 年,研究人员通过同源克隆的方法,成功克隆了绿盲蝽的 *AlucOrco* 基因;使用 RNAi 方法干扰 *AlucOrco* 基因表达后的绿盲蝽对于反-2-己烯醛和乙酸反-2-己

烯酯的 EAG 反应显著降低(Zhou *et al.*, 2014)。在 2015 年,严曙伟等克隆了 4 条绿盲蝽气味受体基因,分别是 *AlucOR*12, *AlucOR*18, *AlucOR*28 和 *AlucOR*30;进行功能鉴定后发现 AlucOR28 是顺-3-己烯基乙酸酯等花香气味物质的气味受体,但是未找到其他 3 个受体的气味配体(Yan *et al.*, 2015)。除此之外,现在还没有关于绿盲蝽气味受体的研究报道。研究绿盲蝽普通气味受体有利于我们深入了解绿盲蝽的气味识别机制,从而为绿盲蝽防治提供新的途径。在实验室前期工作中,收集绿盲蝽触角组织,通过触角转录组测序和生物信息学分析获得了多条绿盲蝽气味受体基因序列。本研究中我们首次克隆并命名了绿盲蝽的气味受体基因 *AlucOR*40 并对其表达模式和功能进行了研究,并推测其在绿盲蝽交配过程中雄虫对雌虫的识别中发挥作用。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫和组织收集

本实验所用的绿盲蝽采自中国农业科学院廊坊基地,在中国农业科学院植物保护研究所实验室中使用新鲜四季豆和玉米进行人工饲养。饲养温度为 28±1℃,相对湿度为 65%±5%,光周期为 16L∶8D。实验用绿盲蝽在塑料盒中混合饲养,按需收集羽化后 3 d 的雌雄虫触角、头(无触角)、胸、腹和足等组织,用液氮迅速冷冻,然后置于 -70℃ 冰箱保存。按同样方式收集各组织样品 3 套作为 3 次生物学重复用于下步半定量 RT-PCR 检测。

1.2 RNA 提取和 cDNA 的合成

使用 Trizol 试剂(Invitrogen, 美国)提取绿盲蝽成虫不同组织的总 RNA,详细方法按照说明书操作。提取的 RNA 通过 NanoDrop-2000(NanoDrop Products, 美国)和 1% 琼脂糖凝胶电泳来检测质量。分别取各个组织 2 μg 的 RNA,以 OligdT 为引物,合成 cDNA,以此 cDNA 作为 PCR 和半定量 RT-PCR 的模板,详细步骤参照 First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, 美国)使用手册。

1.3 引物设计

实验室前期已完成了绿盲蝽触角转录组的测序和分析,从其转录组中得到多条气味受体基因。其中 *AlucOR*40 经前期验证具有完整的开放阅读框,因此选择此基因进行下一步的研究工作。*AlucOrco* (GenBank 登录号: KC881255)之前已经被成功克隆(Zhou *et al.*, 2014)。基因的克隆引物和半定量引物都是使用 Primer Premier 5.0 软件来进行设计。在 RT-PCR 半定量实验中,内参基因选择的是绿盲蝽持家基因 *AlucActin*(GenBank 登录号: KU188517)。实验中所用的引物序列见表 1。本实验中的引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 本实验所用引物

Table 1 Primers in this study

引物名称 Primer names	引物序列(5′-3′) Primer sequences
基因克隆引物 Primers for gene cloning	
AlucOR40-F	TACGGGCCCGCCACCATGTTTCGTGGCAAGGAGAA (*Apa* I)
AlucOR40-R	TCAGCGGCCGCTCACTTCATGGCTCTCAACATG (*Not* I)
AlucOrco-F	GAAGATCTATGCAGAAAGTGAAGATGCACG (*Bgl* II)
AlucOrco-R	ATTTGCGGCCGCTTATTTGAGCTGCACCAACACC (*Not* I)
半定量引物 Primers for semi-quantitative RT-PCR	
AlucOR40-RTF	CAATATGCTGTACGTCCTGCTGT
AlucOR40-RTR	AAGTGTCTTCAAAGTGCTGCTTC
AlucActin- RTF	GCCGTGACTTGACTGACTACCTG
AlucActin- RTR	ATGGAGTTGTAGACGGTTTCGTG

括号内为限制性内切酶名称,酶切位点在序列中以下划线表示。The restriction enzyme of each primer is marked in parenthesis behind the sequence, and the restriction sites are underlined.

1.4 基因的克隆

以绿盲蝽触角 cDNA 为模板,利用基因克隆引物扩增 *AlucOR*40 和 *AlucOrco* 的完整开放阅读框序列。由于嗅觉受体为异源二聚体,绿盲蝽的普通气味受体需要同 AlucOrco 在爪蛙卵母细胞中共表达才能拿发挥作用,所以本研究还需要克隆 *AlucOrco*。PCR 反应体系:5×PS Buffer 缓冲液 10 μL(含 Mg^{2+}),dNTPs 4 μL(2.5 mmol/L),正向和方向引物各 1 μL(10 μmol/L),Primer Star 高保真酶(宝生物,大连) 0.5 μL(5 U/μL),加超纯水至 50 μL。将 PCR 管放在振荡器上混匀,瞬时离心,放入 PCR 仪中进行扩增。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min;98℃ 变性 10 s,56℃ 退火 15 s,72℃ 延伸 120 s,35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,将条带进行切胶回收。将回收的 PCR 产物连接到 pEASY-Blunt 克隆载体(全式金生物技术有限公司,北京)上,然后转入 Trans-1-T1 感受态细胞(全式金生物技术有限公司,北京),提取质粒并测序(华大基因,北京)。除了引物不相同,需要使用基因特异性的克隆引物,*AlucOrco* 的基因克隆过程相同。

1.5　序列分析

使用 EXPASY（Expert Protein Analysis System，http://www.expasy.org）中的 Translate Tool（http://web.expasy.org/translate）将 *AlucOR*40 的核酸序列翻译成氨基酸序列。通过 TMPRED（http://ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html）进行跨膜结构域预测。使用 ClustalW2（http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/）软件将 AlucOR40 的氨基酸序列与绿盲蝽受体 AlucOR12，AlucOR18，AlucOR28，AlucOR30 和 AlucOrco 的氨基酸序列（GenBank 序列号：KP010358，KP010359，KP010360，KP010361 和 KC881255）进行比对（Zhou *et al*., 2014；Yan *et al*., 2015）。

1.6　半定量 RT-PCR

以羽化后 3 d 的雌、雄虫成虫的触角、头（无触角）、胸、腹和足 cDNA 为模板，通过半定量 RT-PCR 检测 *AlucOR*40 在不同组织中的表达情况，RT-PCR 反应体系为 20 μL：cDNA 模板 2 μL，上、下游引物各 1 μL（10 μmol/L），2 × TaqMasterMix PCR 混合液（康为世纪，北京）10 μL，加超纯水至 20 μL。RT-PCR 反应条件：94℃ 预变性 3 min；94℃ 变性 30 s，53℃退火 40 s，72℃延伸 60 s，31 个循环；最后 72℃延伸 10 min。RT-PCR 产物的检测使用的是 2% 琼脂糖凝胶电泳，使用 GelDoc XR 凝胶成像系统（Bio-Rad，美国）成像。使用分别独立的 RNA 进行 3 次重复。

1.7　表达载体构建和 cRNA 合成

克隆载体上的 *AlucOR*40 基因测序正确后，通过 *Apa* I 和 *Not* I 双酶切，亚克隆到表达载体 pT7Ts-oligo 上。连接体系为：6 μL 双酶切过的基因片段、2 μL 双酶切过的 pT7Ts-oligo 载体、1 μL 10 × T4 Ligase Buffer 和 1 μL T4 Ligase。连接条件为：16℃下过夜连接。然后连接体系转化天根 Top10 感受态细胞，过夜培养，挑取 8 个阳性克隆进行菌液 PCR 验证（体系和条件同 1.4 节），连接成功的克隆用液体 LB（含 100 μg/mL Amp^+）过夜培养后送测序。测序正确的克隆，提取质粒使用 *Sma* I 进行单酶切线性化，使用试剂盒 mMESSAGE mMACHINE T7（Ambion，美国）进行 cRNA 的合成。AlucOrco 的 cRNA 合成方式基本相同，双酶切所使用的酶不同，分别是 *Bgl* II 和 *Not* I，线性化的单酶切所使用的酶是 *Sma* I。

1.8　气味化合物

实验中共使用 60 种气味化合物，序号和名称见表 2。其中 1 – 3 号气味为绿盲蝽性信息素成分（张涛，2011），由中国农业科学院植物保护研究所宁君研究员合成和赠送；其余 57 种气味均购自 Sigma-Aldrich 公司（纯度≥95%）。

双电极电压钳实验所用 60 种气味，都以 DMSO 配成 1 mol/L 储存液，保存在 –20℃ 冰箱备用。每次实验前，使用 1 × Ringer（96 mmol/L NaCl，2 mmol/L KCl，5 mmol/L $MgCl_2$，0.8 mmol/L $CaCl_2$ 和 5 mmol/L HEPES，pH 7.6）将储存液稀释到实验所用浓度。

触角电位检测实验所用反-2-己烯醇和正己醇，使用正己烷中配成 10 μg/μL 的浓度。

1.9　爪蟾卵母细胞表达和双电极电压钳记录

双电极电压钳记录方法参照前人的方法（Lu *et al*., 2007；Wang *et al*., 2010）。将 1 μL 浓度为 2 μg/μL 的 AlucOR40 cRNA 和 1 μL 同样浓度的 AlucOrco cRNA 混匀，然后注射到健康且成熟的爪蟾卵母细胞中，每个细胞的注射量为 27.6 ng。以注射 2 μL 水的爪蟾卵母细胞作为对照。注射过 cRNA 的细胞在培养液（1 × Ringer，5% 马血清，50 μg/mL 四环素，100 μg/mL 链霉素和 550 μg/mL 丙酮酸钠）中，18℃恒温培养 3 d。随后用 OC-725C 双电极电压钳记录卵母细胞对于不同气味刺的反应。数据记录和分析是通过 pCLAMP 10.2 和 Digidata 1440A 数模转化器来完成。各待测气味刺激卵母细胞所引起反应数据利用 One-way ANOVA 进行统计分析。

1.10　触角电位检测

对可以激活 AlucOR40 的气味化合物，我们进一步通过触角电位仪检测其是否可以引起绿盲蝽的 EAG 反应。取羽化后 3 d 的绿盲蝽成虫，进行 CO_2 麻醉，并放置于体式显微镜下，用刀片将其触角从基端切下，再从末端将其切除一小部分，随后采用导电胶将其双端都粘附在电极上，待基线平稳即可记录。取 10 μL 的 10 μg/μL 的反-2-己烯醇溶液，加在滤纸片（0.5 cm × 5 cm）上，将滤纸片放于巴斯德管内，同时制备 10 μg/μL 的己醇滤纸片（CF）作为阳性对照（陈展册等，2010）和正己烷滤纸片（CK）作为阴性对照。触角电位仪的详细参数为：连续流量为 30 mL/s，刺激气流为 10 mL/s，刺激时间是 0.2 s。将巴斯德管细端插入进样口，踩踏板，观察并记录反应大小。由于绿盲蝽触角比较小，离体的情况下活性会迅速下降，所以在测定绿盲蝽 EAG 反应的时候按照 CK、CF 和待测气味的顺序测定一根触角，且一根触角只使用一次，两次刺激的间隔时间为 30 s。随后，再取触角进行重复，雌雄虫触角都进行 6 次以上的重复。

表 2 本研究所使用的气味分子

Table 2 Odorants used in this study

序号 No.	名称 Name	序号 No.	名称 Name
1	4-氧代-反-2-己烯醛(*E*)-4-Oxo-2-hexenal	31	反-2-己烯醇(*E*)-2-Hexenol
2	反-2-丁酸己烯酯(*E*)-2-Hexenyl butyrate	32	4-乙基苯甲醛 4-Ethylbenzaldehyde
3	丁酸己酯 Hexyl butyrate	33	3-乙烯基苯甲醛 3-Vinylbenzaldehyde
4	香叶醇 Geraniol	34	(1*R*)-(-)-桃金娘烯醛(1*R*)-(-)-Myrtenal
5	顺-2-己烯-1-醇(*Z*)-2-Hexen-1-ol	35	苯甲醛 Benzaldehyde
6	庚醇 1-Heptanol	36	庚醛 Heptanal
7	马鞭草烯醇(-)-Verbenone	37	顺-3-己烯基乙酸酯(*Z*)-3-Hexenyl acetate
8	正已醇 1-Hexanol	38	乙酸反-2-己烯酯(*E*)-2-Hexenyl acetate
9	(*S*)-顺式-马鞭草烯醇(*S*)-(*Z*)-Verbenol	39	丁香酚 Eugenol
10	反式-3-己烯-1-醇(*E*)-3-Hexen-1-ol	40	1,4-二乙基苯 1,4-Diethylbenzene
11	3,7-二甲基-3-辛醇 3,7-Dimethyl-3-octanol	41	4′-乙基苯乙酮 4′-Ethylacetophenone
12	顺-3-己烯-1-醇(*Z*)-3-Hexen-1-ol	42	乙酸苄酯 Benzyl acetate
13	β-香茅醇 β-Citronellol	43	正十四烷 Tetradecane
14	乙酸己酯 Hexyl acetate	44	乙酸壬酯 Nonyl acetate
15	(-)-反式-松香芹醇(-)-(*E*)-Pinocarveol	45	辛醇 1-Octanol
16	(-)-芳樟醇(-)-Linalool	46	罗勒烯 Ocimene
17	芳樟醇 Linalool	47	正十三烷 Tridecane
18	苯甲酸甲酯 Methyl benzoate	48	水杨酸甲酯 Methyl salicylate
19	已酸乙酯 Ethyl hexanoate	49	β-紫罗兰酮 β-Ionone
20	月桂烯 Myrcene	50	樟脑(±)-Camphor
21	(*R*)-(+)-柠檬烯(*R*)-(+)-Limonene	51	橙花叔醇 Nerolidol
22	α-蒎烯 α-Pinene	52	2,6-二叔丁基苯酚 2,6-Di-tert-butylphenol
23	(-)-β-蒎烯(-)-β-Pinene	53	1-氨基蒽 1-Aminoanthracene
24	莰烯 Camphene	54	2-十五烷酮 2-Pentadecanone
25	α-律草烯 α-Humulene	55	苯乙酮 Acetophenone
26	(*S*)-(-)-柠檬烯(*S*)-(-)-Limonene	56	异丙基苯 Cumene
27	α-松油烯 α-Terpinene	57	乙酸辛酯 Octyl acetate
28	(-)-反式-石竹烯(-)-(*E*)-Caryophyllene	58	苯甲醛 Benzaldehyde
29	(-)-氧化石竹烯(-)-Caryophyllene oxide	59	水杨醛 Salicylaldehyde
30	金合欢烯,异构体混合物 Farnesene, mixture of isomers	60	反式-2-己烯醛(*E*)-2-Hexenal

反-2-己烯醇的 EAG 反应相对值的计算公式为:EAG 反应相对值 =(标样反应平均值 - 对照反应平均值)/(标准参照反应平均值 - 对照反应平均值)。对于雌雄虫之间的 EAG 反应相对值的差异显著性比较采用 *t* 检验进行分析。统计分析的软件采用 SPSS 23.0。

2 结果

2.1 绿盲蝽普通气味受体基因 *AlucOR*40 的基因克隆和序列分析

根据实验室前期对绿盲蝽转录组测序分析所得的实验结果,设计克隆引物,克隆得到 *AlucOR*40 的完整开放阅读框序列(GenBank 登录号:KU886190)。*AlucOR*40 基因开放阅读框全长为 1 197 bp,编码 398 个氨基酸。TMPRED 预测出 AlucOR40 具有 7 个跨膜结构域,分别位于第 41 - 59, 72 - 90, 131 - 152, 181 - 208, 280 - 299, 302 - 321 和 352 - 370 位(图 1),N 末端位于细胞膜内,C 端位于胞膜外。通过序列比对发现,AlucOR40 同 AlucOrco 的氨基酸序列一致性为 16.03%,而同其他的绿盲蝽 OR 的氨基酸序列一致性为 12% ~18%。

2.2 *AlucOR*40 在绿盲蝽雌雄虫不同组织中的表达模式

采用半定量 RT-PCR 的方法检测了 *AlucOR*40 在绿盲蝽雌雄虫触角、头(无触角)、胸、腹和足等 5 个不同组织中的表达水平。实验结果表明 *AlucOR*40 只在触角中特异表达,且在雄虫触角中的表达水平高于雌虫触角,而在其他组织中均未检测到 *AlucOR*40 的表达(图 2)。

```
                                                                                   TM 1
AlucOR12    --MKFIDKLAEEEDDELIEILKGNYWHFLFYSMTFIRWKRPRIAIALISAYAIWIIVHLVIGIYSIYLAAD    69
AlucOR18    --MSFSFVEKYQLSPETEKTMVTEYSYLLYVGGLLINYRP---KVWIISIAQTSIFIGLITSYTIIFIIST    66
AlucOR28    MAGYGRLEDGDIVDGLSIWYLKASGLWEMFNHHRETGGRSKVLKFWMAGMIIAYSPVFVVSVVGPFFAEKD    71
AlucOR30    --MVEKSNFHVKRAQLFKAYNSIHWLTLTKWFYEDYPVEKLWSDKRLWIHLSIVIICQSSITMFKVFHLIS    69
AlucOR40    -----MFRGKEKERPYVIKDPKDFDTDRLVFLWLGFVYDGSFFSKVRLTVFVLLLYSAPIHHMLPVILDKS    66
AlucOrco    ---MQKVKMHGLVGDLWPNIRLMQLTGHWLLEYHEENGGMLRLLRMAYCWMTTFSIYIQYAFLVCFLILET    68

                    TM 2
AlucOR12    ERNWAVVGLVTHHMVLGALAIYLPIFCNTGGFREVMADMHRTFTTDIGQYSGGNMYAEQACIDIKKDVRRQ   140
AlucOR18    AKSSNFVAFSQNLNYASLCCICLGLYFAGLSHRSAFVRLMEIIHDDFYDYGDSFDNAEVAMWKSSLRTFKI   137
AlucOR28    LEGMSLVVLNPMSTVQMVVKFGILWFHMEKQSRLLDLMKKNFLACVPPDKEAEVSRILGDAVKEANIYTFF   142
AlucOR30    EENFFIFLTSLTSFLVIVLVAVRTYILYQFPTFRQLYFKPEVFNCNLHRPTRSLALLTEAITHSRKVG---   137
AlucOR40    TTTDEVLIALSINMLYVLLCIAWPFMIYRS---PEIIRLWSTVRQGFFHYSDPLTSYERTILSKAN-----   129
AlucOrco    YNADEMAAVTITTLFFLHSVTKFTYFAFRSSYFYRTLGAWNQVNSHPLFAESNARHRATALSRMRKLLMII   139

                         TM 3
AlucOR12    TFVYYINPALVAAAGSLALAGPFLTKWFSGMENPYSPNGLSLKLP---TALYYPFPTDSGVVFYAIVLTQV   208
AlucOR18    IIVVGIPTYLIIIAVSIVLGDYIDTALGYDSTDEDYLGEIYQKAP---LNLWYPFVVTNMFLRVAVTLSQM   205
AlucOR28    GTRINIITVLLWSILPVLRSEYFRITLGITIFGTPLRHNKLLGFS---YPFDYDASPGNEIVFVYEFLLVL   210
AlucOR30    --------MWCLVLFITFDVAFLVLPIVPPILEIIDGTNKTYDEL---IPQYPSINPVSLSWLSKELKYAF   197
AlucOR40    --------DLIIKSTRMSLIAYFCAGFGTYLKEMSPNSMRLYNPP---YPGWFPWTINSNFRFAMALLYQL   189
AlucOrco    G------TVTILAVFGWTTVTFLDEPVWDKTDPDNVNETISVEIPQLMVYAWYPWDARYGMTYFMTFVFQL   204

                TM 4
AlucOR12    ISGTILGYLILAPQLVFINLSQNLKRELRFVGYSMETLVRRAMRMTFENNVWKRKVTE-------------   266
AlucOR18    TTAAILATTLATGDVMMLFLGQTVALQLRILCLAATKMDQRAN-LMYEKGLAR----S-------------   258
AlucOR28    SAGLIITVMECLVAQLVVLLT----------------AYLKVFQYFMEELKST------------------   247
AlucOR30    DLVMAVFNTIPWVGFVVVYYT-------------VVQLFRAQHKIMMTAMLPG------------------   237
AlucOR40    S--ICLNTTFALEGIFLLFLFHTISFEG------QISLLKQHFEDTFPPGLPT------------------   234
AlucOrco    YWLFITLAHSNLLDVLFCCFVIFACEQLKHLKEILQPLMELSAALDSVVPNSGDLFKAGSAGSDIALIGNG   275

AlucOR12    ---------------------------------LDVDDTEFQQNVELSIKETIIHHQKASKLLSTAQVSVKG   305
AlucOR18    ---------------------------------SSGDKEDLDGCYKLCIKQLVQHHLIIKEFYKTYYTIAKW   297
AlucOR28    ------------------------------------HDPKFDK---EQLLLYVKEHQKLMRVGDEVCDLYNF   280
AlucOR30    ------------------------------------PPVPGDGREPLELKLWIQDHALIRKLVYKLRNTISP   273
AlucOR40    ---------------------------------EMTHVPAFKERTLKRLKECVRHHLVIMDFHKRILSYFGI   273
AlucOrco    ENGNDFDVRGIYSSQRDFSGFQGGVVNGGTVGPNGLTKRQELLVRSAIKYWVERHKHVVKFVSSIGDTYGS   346

                    TM 5                            TM 6
AlucOR12    PLAASYIFGLVTIAISLYNITLALKTNDIGSLTT-FLLLLSS------EVLGTFLNCGLIGSELTEQSEDV   369
AlucOR18    PTAIAFMNGSLMIAMSIIVAMNGNEETPSTYIST-YLLLVA-------EVLSMWLLC-ETGQNVNTWSEKL   359
AlucOR28    LITVQLSTGLFILIIAIFNFFLSSGNGDVVVMIK-FVVYTLY------TLVEICVYC-YAGSNLETTSEDV   343
AlucOR30    ALAGTICVNVFTVGLNMLALVSSPIGSDAPMFTR-YLYYFSFGTYSALSIFDIFIHC-WLASEITNCGEDL   342
AlucOR40    CLLVYRAICTIMLCILCYLTTTGIALNKFLQLAC-LAALIL---------YLLFIFC-LKGQKVSKMSEIW   333
AlucOrco    ALLLHMLTSTVTLTLLAYQATKIEAVDVYAASTIGYLVYTLG---------QVFVFC-IHGNELIEESSSV   407

                             TM 7
AlucOR12    TEKLYFIEWYNFSVKNRKMFFTFQTAITQPYEIKAGGVTPMN-METFSDIMNSAYSFFNILQTIE-----   433
AlucOR18    FMDTYEFNWNGLSVPNKKMLLIFKENIKKPLLMMAGGLTPIN-RDTFATIMNTSYSYVNLLRASERRSND   428
AlucOR28    CFAAYSCEWYEMNPDFRKTLQMMMVRSRSPVVLKAGKLYPLN-LITLTNIVQMAYSTSMLMYQQTHN---   409
AlucOR30    SYALLKSDWQNDLKRSHHHYVLPLMLCKKQIRFTGLGLIPVT-LTTFTETIRVSYSYFTLLRKTDD----   407
AlucOR40    RETLYEVDWWNHPVEVQKAVLLMLVGAGKTMTVYGVWTPAMYSHEGISAIGQETFSFFNMLRAMK-----   398
AlucOrco    MEAAYSCHWYDGSEEAKTFVQIVCQQCQKSLTVSGAKFFTVS-LDLFASVFGAVVTYFMVLVQLK-----   471
```

图 1　绿盲蝽 ORs 氨基酸序列的比对和跨膜区的预测

Fig. 1　Sequence alignment and transmembrane domain prediction of ORs from *Apolygus lucorum*

保守的氨基酸位点加框，用 TMPRED 预测出的 7（TM1 – TM7）个跨膜结构域用黑实线画出。The conserved amino acid sites are shown in the frame. Seven transmemberane domains（TM1 – TM7）were predicted by TMPRED and indicated by solid lines.

2.3　AlucOR40 的功能分析

将 AlucOR40 与 AlucOrco 在爪蟾卵母细胞中进行共表达，使用双电极电压钳记录系统记录下共表达 AlucOR40/Orco 的卵母细胞对 60 种待测气味的反应。结果显示，共表达 AlucOR40/Orco 的爪蟾卵母细胞只对反-2-己烯醇有反应，对绿盲蝽的 3 种性

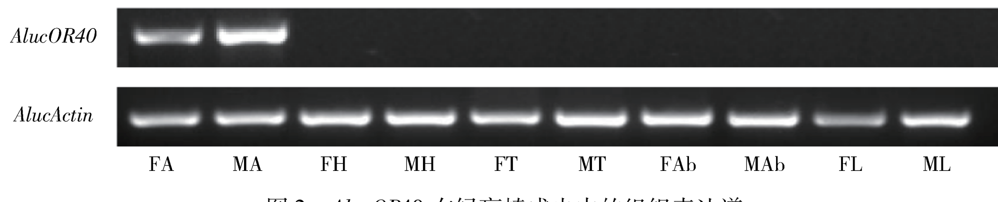


图 2 *AlucOR*40 在绿盲蝽成虫中的组织表达谱

Fig. 2 Tissue expression patterns of *AlucOR*40 in adults of *Apolygus lucorum*

FA：雌虫触角 Female antenna；MA：雄虫触角 Male antenna；FH：雌虫头（无触角）Female head (antenna removed)；MH：雄虫头（无触角）Male head (antenna removed)；FT：雌虫胸 Female throax；MT：雄虫胸 Male throax；FAb：雌虫腹 Female abdomen；MAb：雄虫腹 Male abdomen；ML：雄虫足 Male legs；FL：雌虫足 Female legs.

信息素组分和其他普通气味都没有反应。而对照组中注射水的卵母细胞对全部气味受体都无反应（图 3）。随后测定了共表达 AlucOR40/Orco 的爪蟾卵母细胞对于不同浓度反-2-己烯醇的剂量反应曲线，其 EC_{50}值为 2.773×10^{-4}mol/L（图 3）。

2.4 绿盲蝽对反-2-己烯醇的 EAG 相对反应值

为了研究反-2-己烯醇对于绿盲蝽的实际影响，本研究测定了绿盲蝽雌雄成虫触角对于反-2-己烯醇的 EAG 相对反应值。结果表明：反-2-己烯醇能够引起绿盲蝽触角明显的 EAG 反应，且雄虫触角对于反-2-己烯醇的 EAG 反应要显著大于雌虫触角（图 4）。

3 讨论

对于绿盲蝽 ORs 的研究较少，其主要原因是缺少 ORs 的基因序列信息。在实验室前期绿盲蝽进行了触角转录组测序的基础上，本研究克隆了气味受体基因 *AlucOR*40 的全长序列。通过蛋白质跨膜结构域分析发现 AlucOR40 具有 7 个跨膜结构域，且其 N 末端位于细胞膜内，C 末端位于细胞膜外，符合昆虫气味受体的典型特征（Leal, 2013）。因此，我们确定 *AlucOR*40 为绿盲蝽的气味受体基因。

昆虫的气味受体有很高的特异性，不同的气味受体具有不同的表达模式和功能。而气味受体的表达模式与其功能是密切相关的。性信息素受体一般在雄虫触角中高表达或特异表达，如前人对棉铃虫、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 等鳞翅目昆虫性信息受体的研究中都发现，多数性信息素受体都具有这一特征（Liu CC *et al*., 2013；Liu Y *et al*., 2013；Sun *et al*., 2013）。而普通气味受体的表达情况则比较多变，具有不同的表达模式。有一些普通气味受体在雌雄虫触角具有较为一致的表达水平，如斜纹夜蛾中的 SlituOR12，其可能参与定位寄主等雌雄虫共有的行为活动（Zhang *et al*., 2013）。还有一些普通气味受体在雌虫触角中高表达，例如家蚕 *Bombyx mori* 中的 BmOR19，BmOR45 和 BmOR47 及甜菜夜蛾中的 SexiOR3（Anderson *et al*., 2009；Liu *et al*., 2014），这些受体很可能涉及寻找产卵地点等雌虫特异行为。此外，在棉铃虫、烟青虫 *Helicoverpa assulta* 和二化螟 *Chilo suppressalis* 等昆虫中，也发现了除性信息受体外还有一些普通气味受体也在雄虫触角中高表达（Liu *et al*., 2012；Cao *et al*., 2014；Zhang *et al*., 2015）。国内外针对这种雄虫高表达的普通气味受体的研究还未见报道，尚不知其生物学意义。本研究中克隆的绿盲蝽 *AlucOR*40 也在雄虫中高表达，因此我们对其功能进行了进一步的研究。

双电极电压钳记录的结果显示，AlucOR40 对绿盲蝽的 3 个性信息组分均无反应，只对普通气味反-2-己烯醇有反应。AlucOR40 对于反-2-己烯醇的 EC_{50}值为 2.773×10^{-4} mol/L，而 AlucOR28 对 3 个配体丙烯酸丁酯、丁酸丁酯和丙酸丁酯 EC_{50}值为分别为 1.118×10^{-4}，2.345×10^{-4} 和 1.375×10^{-4} mol/L，两个受体的灵敏度相似（Yan *et al*., 2015）。反-2-己烯醇是很多植物的挥发物组分，对昆虫的寄主识别等过程中发挥重要作用。例如，健康的小麦挥发反-2-己烯醇可以吸引禾谷缢管蚜 *Rhopalosiphum padi*（郭光喜和刘勇，2005）；马铃薯幼苗在被害虫危害后可以挥发更多的反-2-己烯醇来吸引马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*（Bolter *et al*., 1997）；虫害诱导的水稻挥发物中也含有反-2-己烯醇，但它对褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 有明显的驱避作用（周强等，2003）。与一般的植物挥发物不同，很多昆虫自身也可以产生反-2-己烯醇，前人的研究证明绿盲蝽自身就能够释放此种气味，且雌虫释放的量要远大于雄虫（苏建伟等，2010，2012）。

为了研究反-2-己烯醇对绿盲蝽的作用，我们测定了羽化后 3 d 绿盲蝽雌雄虫触角对于反-2-己烯醇

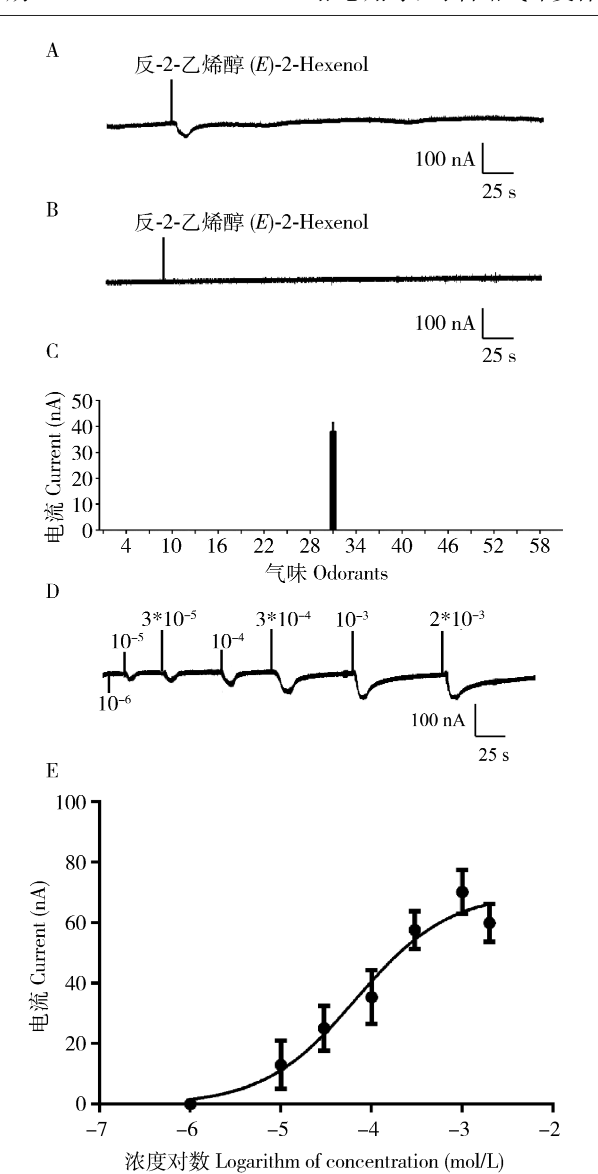


图 3　共表达 AlucOR40/AlucOrco 的爪蟾卵母细胞对反-2-己烯醇的反应

Fig. 3 Responses of *Xenopus* oocytes co-expressed with AlucOR40/AlucOrco to (*E*)-2-hexenol

A：1×10^{-4} mol/L 反-2-己烯醇刺激 AlucOR40/AlucOrco 共表达的爪蟾卵母细胞所引起的反应 Inward current responses of *Xenopus* oocytes co-expressed with AlucOR40/AlucOrco in response to 10^{-4} mol/L (*E*)-2-hexenol；B：注射水的爪蟾卵母细胞对反-2-己烯醇没有反应 *Xenopus* oocytes injected with water failed to respond to (*E*)-2-hexenol；C：AlucOR40/AlucOrco 共表达的爪蟾卵母细胞对植物挥发物反应的柱形统计图(误差线表示标准误，n = 6) Response profile of *Xenopus* oocytes co-expressed with AlucOR40/AlucOrco (error bars indicate *SE*, n = 6)；D：不同浓度反-2-己烯醇对 AlucOR40/AlucOrco 共表达的爪蟾卵母细胞产生的反应 Responses of *Xenopus* oocytes co-expressed with AlucOR40/AlucOrco stimulated by different concentrations of (*E*)-2-hexenol；E：AlucOR40/AlucOrco 共表达的爪蟾卵母细胞对于不同浓度反-2-己烯酯的反应曲线(误差线表示标准误，n = 6)，其 EC_{50} 值为 2.773×10^{-4} mol/L。Dose-response curve of *Xenopus* oocytes co-expressed with AlucOR40/AlucOrco to (*E*)-2-hexenol (error bars indicate *SE*, n = 6), $EC_{50} = 2.773 \times 10^{-4}$ mol/L. 气味分子编号同表 2。The code numbers of odorants see Table 2.

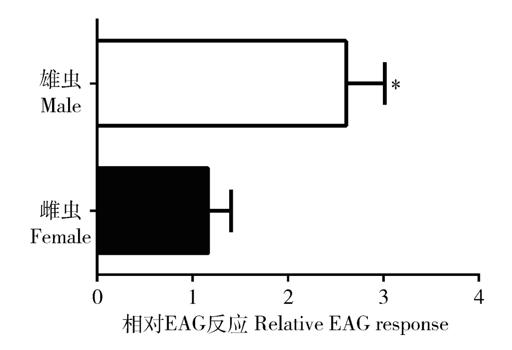


图 4　绿盲蝽雌雄虫触角对反-2-己烯醇的相对 EAG 反应

Fig. 4　Relative EAG response of *Apolygus lucorum* adults to (*E*)-2-hexenol

数据为平均值 ± 标准误，星号示雌雄间差异显著(*t* 检验，$P < 0.05$)。Data are mean ± *SE*, and asterisk indicates statistically significant difference between males and females (Student's *t* test, $P < 0.05$).

的相对触角电位反应。羽化后 3 d 绿盲蝽雄虫触角对于反-2-己烯醇的相对 EAG 反应要显著的高于雌虫触角，且这与羽化后 3 d 绿盲蝽雄虫触角中 *AlucOR*40 的半定量结果相一致。陈展册等(2010)曾测定了羽化后 7 d 的绿盲蝽对于反-2-己烯醇的 EAG 反应，发现其雌雄虫的相对 EAG 反应无显著性差异。为什么羽化 3 d 和 7 d 的绿盲蝽对于反-2-己烯醇的反应存在差异？陈展册(2010)在对绿盲蝽繁殖行为进行研究的过程中发现绿盲蝽羽化后 3 d 的交配率比较低，而羽化后 7 d 的交配率高达 70%。可见绿盲蝽对反-2-己烯醇反应与其交配状态有关，因此我们推测反-2-己烯醇在绿盲蝽的交配过程中发挥了重要的辅助功能，未交配的雄虫可能通过识别植物或雌虫释放的反-2-己烯醇来定位交配对象。在此过程中 AlucOR40 参与了反-2-己烯醇的识别，在绿盲蝽交配过程中雄虫对雌虫的识别中发挥辅助作用。以上推论还需要进一步的 RNA 干扰或者基因沉默实验进行体内功能和行为学验证。此气味受体的研究有助于我们更进一步的了解绿盲蝽的嗅觉机制，为开发绿盲蝽驱避剂和引诱剂打下坚实的理论基础。

参考文献 (References)

Anderson AR, Wanner KW, Trowell SC, Warr CG, Jaquin-Joly E, Zagatti P, Robertson H, Newcomb RD, 2009. Molecular basis of female-specific odorant responses in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39: 189 – 197.

Benton R, Sachse S, Michnick SW, Vosshall LB, 2006. Atypical membrane topology and heteromeric function of *Drosophila* odorant receptors in vivo. *PLoS Biol.*, 4(2): e20.

Bolter CJ, Dicke M, van Loon JJA, Visser JH, Posthumus MA, 1997.

Attraction of Colorado potato beetle to herbivore-damaged plants during herbivory and after its termination. *J. Econ. Entomol.*, 23: 1003 – 1023.

Cao DP, Liu Y, Wei JJ, Liao XY, Walker WB, Li JH, Wang GR, 2014. Identification of candidate olfactory genes in *Chilo suppressalis* by antennal transcriptome analysis. *Int. J. Biol. Sci.*, 10(8): 846 – 860.

Chen ZC, 2010. Studies on Reproductive Behavior and Sex Pheromone of *Lygus lucorum* Meyer-Dür (Hemiptera: Miridae). MSc Thesis, Guangxi University, Nanning. [陈展册, 2010. 绿盲蝽繁殖行为和性信息素的研究. 南宁: 广西大学硕士学位论文]

Chen ZC, Su L, Ge F, Su JW, 2010. Electroantennogram responses of the green leaf bug, *Lygus lucorum* Meyer-Dür (Hemiptera: Miridae), to sex pheromone analogs and plant volatiles. *Acta Entomologica Sinica*, 53(1): 47 – 54. [陈展册, 苏丽, 戈峰, 苏建伟, 2010. 绿盲蝽对性信息素类似物和植物挥发物的触角电位反应. 昆虫学报, 53(1): 47 – 54]

Dobritsa AA, van der Goes van Naters W, Warr CG, Steinbrecht RA, Carlson JR, 2003. Integrating the molecular and cellular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron*, 37(5): 827 – 841.

Guo GX, Liu Y, 2005. Behavioral responses of *Macrosiphum avenae* and *Rhopalosiphum padi* to wheat plant volatiles induced by aphids feeding. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(5): 534 – 536. [郭光喜, 刘勇, 2005. 麦长管蚜和禾谷缢管蚜对小麦植株挥发物及蚜害诱导挥发物的行为反应. 昆虫知识, 42(5): 534 – 536]

Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB, 2004. *Or83b* encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron*, 43(5): 703 – 714.

Leal WS, 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 373 – 391.

Liu CC, Liu Y, Guo MB, Cao DP, Dong SL, Wang GR, 2014. Narrow tuning of an odorant receptor to plant volatiles in *Spodoptera exigua* (Hübner). *Insect Mol. Biol.*, 23(4): 487 – 496.

Liu CC, Liu Y, Walker WB, Dong SL, Wang GR, 2013. Identification and functional characterization of sex pheromone receptors in beet armyworm *Spodoptera exigua* (Hübner). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43(8): 747 – 754.

Liu Y, Gu SH, Zhang YJ, Guo YY, Wang GR, 2012. Candidate olfaction genes identified within the *Helicoverpa armigera* antennal transcriptome. *PLoS ONE*, 7(10): e48260.

Liu Y, Liu CC, Lin KJ, Wang GR, 2013. Functional specificity of sex pheromone receptors in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE*, 8(4): e62094.

Lu T, Qiu YT, Wang GR, Kwon JY, Rutzler M, Kwon HW, Pitts RJ, van Loon JJ, Takken W, Carlson JR, 2007. Odor coding in the maxillary palp of the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *Curr. Biol.*, 17(18): 1533 – 1544.

Lu YH, Wu KM, 2008. Biology and Control of Cotton Mirids. Golden Shield Press, Beijing. [陆宴辉, 吴孔明, 2008. 棉花盲椿象及其防治. 北京: 金盾出版社]

Lu YH, Wu KM, Jiang YY, Xia B, Li P, Feng HQ, Wyckhuys KAG, Guo YY, 2010. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. *Science*, 328(5982): 1151 – 1154.

Mombaerts P, 1999. Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.*, 22(1): 487 – 509.

Pan HS, 2013. Chemical Communication Mechanism between *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür) and Its Fall Host Plants of *Artemisia* Spp. PhD Dissertation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [潘洪生, 2013. 绿盲蝽与秋季蒿类寄主的化学通讯机制. 北京: 中国农业科学院博士学位论文]

Pan HS, Lu YH, Wyckhuys KAG, Wu KM, 2013. Preference of a polyphagous mirid bug, *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür) for flowering host plants. *PLoS ONE*, 8(7): e68980.

Su JW, Chen ZC, Ouyang F, Zhang GZ, Ge F, 2012. Analysis of compounds extracted from male *Apolygus lucorum*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(3): 636 – 640. [苏建伟, 陈展册, 欧阳芳, 张广珠, 戈峰, 2012. 绿盲蝽雄虫体外挥发物研究. 应用昆虫学报, 49(3): 636 – 640]

Su JW, Chen ZC, Zhang GZ, Ge F, 2010. Identification of extracted compounds of female *Lygus lucorum*. *Chinese Bulletin of Entomology*, 47(6): 1113 – 1117. [苏建伟, 陈展册, 张广珠, 戈峰, 2010. 绿盲蝽雌虫的浸提物分析. 昆虫知识, 47(6): 1113 – 1117]

Sun MJ, Liu Y, Walker WB, Liu CC, Lin KJ, Gu SH, Zhang YJ, Zhou JJ, Wang GR, 2013. Identification and characterization of pheromone receptors and interplay between receptors and pheromone binding proteins in the diamondback moth, *Plutella xyllostella*. *PLoS ONE*, 8(4): e62098.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731 – 2739.

Wang GR, Carey AF, Carlson JR, Zwiebel LJ, 2010. Molecular basis of odor coding in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(9): 4418 – 4423.

Yan SW, Zhang J, Liu Y, Li GQ, Wang GR, 2015. An olfactory receptor from *Apolygus lucorum* (Meyer-Dur) mainly tuned to volatiles from flowering host plants. *J. Insect Physiol.*, 79: 36 – 41.

Zhang J, Liu CC, Yan SW, Liu Y, Guo MB, Dong SL, Wang GR, 2013. An odorant receptor from the common cutworm (*Spodoptera litura*) exclusively tuned to the important plant volatile *cis*-3-hexenyl acetate. *Insect Mol. Biol.*, 22(4): 424 – 432.

Zhang J, Wang B, Dong SL, Cao DP, Dong JF, Walker WB, Liu Y, Wang GR, 2015. Antennal transcriptome analysis and comparison of chemosensory gene families in two closely related Noctuidae moths, *Helicoverpa armigera* and *H. assulta*. *PLoS ONE*, 10(2), e0117054.

Zhang T, 2011. The Study of the Extraction, Identification and Application of Sex Pheromone Produced by *Apolygus lucorum*. PhD Dissertation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [张涛, 2011. 绿盲蝽(*Apolygus lucorum*)性信息素的提取鉴定

及应用研究. 北京：中国农业科学院博士学位论文]
Zhou Q, Xu T, Zhang GR, Gu DX, Zhang WQ, 2002. Repellent effects of herbivore-induced rice volatiles on the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stäl. *Acta Entomologica Sinica*, 46(6): 739 – 744. [周强, 徐涛, 张古忍, 古德祥, 张文庆, 2003. 虫害诱导的水稻挥发物对褐飞虱的驱避作用. 昆虫学报, 46(6): 739 – 744]
Zhou YL, Zhu XQ, Gu SH, Cui HH, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2014. Silencing in *Apolygus lucorum* of the olfactory coreceptor Orco gene by RNA interference induces EAG response declining to two putative semiochemicals. *J. Insect Physiol.*, 60: 31 – 39.

（责任编辑：袁德成）